

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008年度～2009年度
 課題番号：20790268
 研究課題名 (和文) 経皮水分蒸散量と皮膚バリア遺伝子多型に基づいたアトピー性皮膚炎
 関連遺伝子の探索
 研究課題名 (英文) The isolation of atopy dermatitis association genes based on
 transepidermal water loss and gene polymorphism of skin barrier
 association genes
 研究代表者
 佐々木 貴史 (TAKASHI SASAKI)
 東京理科大学・総合研究機構・講師
 研究者番号：70306843

研究成果の概要 (和文) :本研究では、アトピー性皮膚炎患者の皮膚バリア遺伝子 (LEP7, hKPRP, LCE1F, SPRR2E) の配列を解読した。その結果、これまでに関与が明らかになっている FLG 以外の皮膚バリア遺伝子では、バリア破綻の原因となる遺伝子変異は同定できなかったが、これらの遺伝子の多型頻度を解明する事ができた。これらを正常コントロールと比較する事によりこれらの遺伝子のアトピー性皮膚炎への関与が明らかになると期待される。

研究成果の概要 (英文) : In this study, I determined the DNA sequence of skin barrier associated genes (LEP7, hKPRP, LCE1F, SPRR2E) derived from atopy dermatitis patients. As a result, I did not find critical mutations which would cause dysfunction of skin barrier in these genes, however, I decided the frequency of polymorphism of these genes in atopy dermatitis patients. I expect that the comparison these polymorphisms of these genes between atopy dermatitis patients and controls would be clear the relationships among these genes and atopy dermatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子診断学・アトピー性皮膚炎、フィラグリン、経皮水分蒸散量

1. 研究開始当初の背景

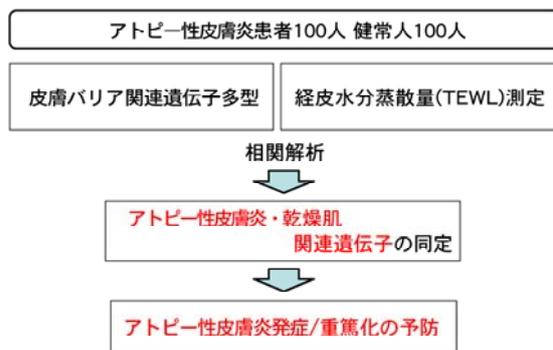
アトピー性皮膚炎 (AD) は、寛解・増悪を繰り返す、そう痒のある湿疹を主病変とする皮膚疾患として定義され、患者の多くは遺伝的アトピー素因を持つとされている

ものの、現在までに明らかに成っていない。発展途上国よりも先進諸国に多くみられ、日本においては 21 世紀の国民病ともいわれられており、患者数は 40 万人を超え現在も激増している。一方、尋常性魚鱗癬 (IV) は、

皮膚の乾燥により皮膚表面が硬化し剥落する疾患であり、AD 様のアレルギー様症状は示さず、特に医師の診断を受ける必要がない場合も少なくない。この2つの皮膚疾患は、IV ではほぼ 100%、AD ではヨーロッパ患者集団で約 50%（日本人集団に関しては後述）の患者にフィラグリン(FLG) 遺伝子変異がみられ、フィラグリントタンパク質量低下が皮膚保湿能低下及びバリア能低下が引き起こしていると考えられている。さらに、AD では皮膚バリア異常のために過剰な抗原暴露がおこり、その結果、免疫過剰惹起により免疫異常が引き起こされていると考えられている。

フィラグリンは皮膚の主要構成因子の一つで、フィラグリントタンパク質は約 500kDa のプロフィラグリンとしてタンパク質に翻訳後、プロセッシングを受けて 35-45kDa のフィラグリントタンパク質となり、さらに修飾酵素により相互及び他のバリアタンパク質と相互架橋し強固な皮膚バリアを形成する。そのゲノム構造は3つのエキソンからなるが、第3エキソンに 35-45kDa のフィラグリンに相当する 972bp を単位とした配列が 11-13 回繰り返されている。

そのため通常の DNA シーケンシング法では解読不可能であったが、申請者はヒトゲノム計画で培ったノウハウを応用して新たな解読法(FLG-shotgun 法)を確立した。この方法を用いて日本人 AD 患者の解析を行ったところ、ヨーロッパで同定された変異は日本人集団に存在せず、2種の新規ナンセンス変異を同定した。日本人集団で既に同定されている2種のナンセンス変異の解析



もあわせて行い、現在までに 7%の日本人 AD 患者からフィラグリンの変異を同定した。以上の結果から、フィラグリンは IV 及び AD の両方の原因遺伝子の一つであり、同一の変異を有する人でも IV、AD、両方を合併する人がいるが重篤度は人によって異なり、フィラグリンの変異のみに依存して症状が決定せず、他の皮膚バリア関連遺伝子の関与が示唆された。

2. 研究の目的

皮膚バリアを形成する主だった遺伝子は1番染色体長腕に 30 以上の遺伝子がクラスターを形成して存在し、EDC(Epidermal differentiation complex)と呼ばれている。この中で mRNA の発現量が多い遺伝子は、タンパク質量としても多くバリア機能に大きく寄与している事が予想される。しかし現在までに、これらの皮膚バリア遺伝子群遺伝子多型と乾燥肌/皮膚バリア機能との相関解析はほとんど行われていない。

そこで、AD 患者群及び健常人群を対象として、フィラグリンをはじめとする皮膚バリア関連遺伝子群の多型解析及び皮膚バリア機能の指標として経皮水分蒸散量(TEWL)の相関解析を行い、アトピー性皮膚炎関連遺伝子及び乾燥肌関連遺伝子の同定を目指す。その結果を AD 患者及び健常人に含まれる潜在的乾燥肌の人にフィードバックすることによりスキンケアを促し、アトピー性皮膚炎を発症前に予防する、もしくは重篤化を防ぐ事を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、皮膚バリア遺伝子群と皮膚バリア機能の関連解析を行うために、以下の2つを中心に実験し、その結果に既存のデータを含めて相関解析する。

① EDC に存在する 8 遺伝子を対象としたゲノム配列解析

FLG, FLG2, LEP7, hKPRP, LCE1F, IVC, SPRR2E, LOR の 8 遺伝子を対象にゲノム配列解析を行う。LEP7, hKPRP, LCE1F, IVL, SPRR2E, LOR は、タンパク質コーディング全領域の配列決定を行う。FLG 及び FLG2 は

タンパク質コーディング全領域の解読は困難であるため、遺伝子型及びすでに同定されている疾患の原因となる変異の同定を行う。これらの配列決定は、AD患者100人と健常人100人に対して行う。

② バリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) 測定

経皮水分蒸散量は、非発汗条件下で角層を通じて蒸発してくる水分量を経時的に測定し、湿度勾配として測定する値である。ヒトの正常皮膚のTEWL値は3-6g/m²/hr程度あり、これはポリエチレン製の袋から蒸発する水分量(2g/m²/hr)程度と変わらず、非常に微量である。環境(温度、湿度)や測定部位(腕の内側、外側など)により大きく異なる事が予想されることから、測定法の確立から行う。

4. 研究成果

1) EDC に存在する SPRR2E を対象としたゲノム配列解析

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室で収集されたAD患者96人に対して、EDC内に存在する遺伝子SPRR2Eの解析を行った。SPRR2Eは2exonから構成され、全ORFはexon2に含まれている。そこでPCR法を用いてexon2(636bp)全体を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行い変異及び遺伝子型の分類を行った。その結果、ナンセンス変異を同定することは出来なかったが、既知の3種のSNPsを含む6SNPsを同定した。この内2種のSNPsの組み合わせから、SPRR2Eの主要な遺伝子型をType A/B/Cに分類した。また、残りの4種のSNPsはすべてTypeCのアレル由来であった。それぞれのアレル頻度は、Type A(57.9%)、Type B(31.8%)、Type C(10.3%)であった。

2) EDC に存在する LCE1F を対象としたゲノム配列解析

EDC内に存在する遺伝子LCE1Fの解析を行

った。LCE1Fは1exonから構成されている。そこでPCR法を用いて全ORF領域(357bp)を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行い変異及び遺伝子型の分類を行った。その結果、16番目のシステイン残基においてナンセンス変異(TGC→TGA)を同定した。この結果からType A/Bに分類した。また、Type Aの一部に18bpの挿入配列(CTGCTGCAGCTCTGGGGG)を同定した。これらの結果から、LCE1Fの主要な遺伝子型をType A/A1/Bに分類し、それぞれのアレル頻度は、Type A(87.4%)、Type A1(8.4%)、Type B(4.2%)であった。

3) EDC に存在する SPRR2E を対象としたゲノム配列解析

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室で収集されたAD患者96人に対して、EDC内に存在する遺伝子SPRR2Eの解析を行った。SPRR2Eは2exonから構成され、全ORFはexon2に含まれている。そこでPCR法を用いてexon2(636bp)全体を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行い変異及び遺伝子型の分類を行った。その結果、ナンセンス変異を同定することは出来なかったが、既知の3種のSNPsを含む6SNPsを同定した。この内2種のSNPsの組み合わせから、SPRR2Eの主要な遺伝子型をType A/B/Cに分類した。また、残りの4種のSNPsはすべてTypeCのアレル由来であった。それぞれのアレル頻度は、Type A(57.9%)、Type B(31.8%)、Type C(10.3%)であった。

4) EDC に存在する LCE1F を対象としたゲノム配列解析

EDC内に存在する遺伝子LCE1Fの解析を行った。LCE1Fは1exonから構成されている。そこでPCR法を用いて全ORF領域(357bp)を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行い変異及び遺伝子型の分類を行った。その結果、16番目のシステイン残基においてナンセンス変異(TGC→TGA)を同定した。この結果からType A/Bに分類した。また、Type Aの一部に18bpの挿入配列(CTGCTGCAGCTCTGGGGG)を

同定した。これらの結果から、LCE1F の主要な遺伝型を Type A/A1/B に分類し、それぞれのアレル頻度は、Type A(87.4%)、Type A1(8.4%)、Type B(4.2%)であった。

5) 経皮水分蒸散量(TEWL)測定的确立

経皮水分蒸散量測定は、非発汗条件下で角層を通じて蒸発してくる水分量を経時的に測定し、湿度勾配として測定する方法である。16℃の部屋で30分間安静後と、20℃の部屋で測定を行ったところ、同一人物でも20℃の部屋で高値(4℃では6g/m²/hr程度であったが、20℃では20-30g/m²/hr)を示す例が観測された。これらは、同日の測定でも観測された事から、本人も感じない程度の発汗による影響と考えられた。ADが原因となる場合は、20-30 g/m²/hrの値を示す事から、この条件下では、正確に測定が困難である事が示唆された。このことから、発汗が多い体質の人は、自ら発汗を感じない温度でも発汗をしている可能性があり、正確なTEWL値測定のためには完全に発汗が治まる温度(16℃程度)の部屋で安静にした後に測定する事が必要である事が明らかになった。

これらの結果は、診断において TEWL 値を測定する際に、測定日の天候の条件(部屋の気温、湿度)や測定するまでの待機状況(待合室や診療室の温度)に大きく影響されうることをしめしている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

Sasaki, T., Kudoh, J., Ebihara, T., Shiohama, A., Asakawa, S., Shimizu, A., Takayanagi, A., Dekio, I., Sadahira, C., Amagai, M., Shimizu, N.: Sequence analysis of filaggrin gene by novel shotgun method in Japanese atopic dermatitis. *J Dermatol. Sci.* 51(2):113-120 (2008)

Fallon, P, Sasaki T, Sandilands, A, Campbell, L, Saunders, S, Mangan N, Kawasaki, H, Shiohama, A, Kubo, A, Sundberg, J, Presland, R, Fleckman, P,

Shimizu, N, Kudoh, J, Irvine, A, Amagai, M, McLean, WHI. A homozygous frameshift mutation in the murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nature Genetics* 41(5):602-608 (2009).

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 貴史 (SASAKI TAKASHI)

東京理科大学・総合研究機構・講師

研究者番号: 700306843

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし